

Title	Precise Region and the Character of the pathogenicity Island in Clinical <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Author(s)	杉山, 友彦
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49171">https://hdl.handle.net/11094/49171</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	すぎやまともひこ 杉山友彦
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 21967 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学位論文名	腸炎ビブリオ Pathogenicity Island の領域決定と分子遺伝学的解析
論文審査委員	(主査) 教授 本田 武司 (副査) 教授 那須 正夫 教授 山口 明人 教授 岡部 勝

### 論文内容の要旨

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は好塩性のグラム陰性桿菌である。一部の腸炎ビブリオは、ヒトに激しい腹痛を伴う下痢を引き起こす食中毒の原因菌となる。疫学的な調査により、耐熱性溶血毒 (Thermostable Direct Hemolysin, TDH) 遺伝子と耐熱性溶血毒類似毒素 (TDH-related Hemolysin, TRH) 遺伝子が、病原性の遺伝マーカーとして有用であることが分かっている。これらの遺伝子の有無は、海洋、食品、患者便などから分離される腸炎ビブリオ菌株の病原性/非病原性の判別に用いられている。腸炎ビブリオの遺伝学的特徴として、大小 2 つの環状染色体を持つ細菌であることがあげられる。ヒト病原性腸炎ビブリオ RIMD2210633 株の全ゲノム配列解読によって、小染色体 (ChrII) 上の一部領域が Pathogenicity Island (PAI) であることが提唱された。PAI は、水平伝播によって獲得され、病原遺伝子をコードし、同種または近縁の非病原株には見られない領域である。

PAI は、病原性獲得や進化といった点から医学的また分子遺伝学的に重要な因子である。しかし、腸炎ビブリオ RIMD2210633 株 (*tdh* 陽性) の PAI (Vp-PAI) については、染色体上での明確な境界が不明のままであり、病原株のみが持つ遺伝子群が正確に把握できていなかった。また、分子遺伝学的な背景に関する知見に乏しかったことから、本研究ではそれらの点を明らかにすることを目的とした。

Vp-PAI の境界を決定するために、*tdh*、*trh* 陰性腸炎ビブリオ RIMD2212481 株のゲノムライブラリーを作製し、Vp-PAI の外側かつ近傍に位置する遺伝子をプローブとして、目的のクローンを選別後、シーケンシングした。その結果、クローン化した RIMD2212481 株由来 DNA 領域には染色体リアレンジメントが起きていた。RIMD2212481 株以外にも *tdh* and/or *trh* 陽性株 8 株と *tdh*、*trh* 陰性株 4 株について調べたところ、*tdh*、*trh* の有無に関わらず共通して腸炎ビブリオ ChrII には染色体リアレンジメントが起きたものがあることが明らかとなった。

腸炎ビブリオ RIMD2210633 株 (*tdh* 陽性) の PAI (Vp-PAI) の正確な境界を決定するためには、染色体リアレンジメントが起きていない菌株から得られる塩基配列で比較したほうが容易であると考えられた。そこで、染色体リアレンジメントの起きていない *tdh*、*trh* 陰性株 RIMD22121918 株を用いて、Vp-PAI の境界を決定した。Vp-PAI は、RIMD2210633 ChrII 上の 1,387,705 から 1,467,746 (bp) まで続く領域で、80,042 bp からなる DNA 領域であることが明らかとなった。Vp-PAI は、VPA1310-VPA1396 の遺伝子を持ち、その挿入点は VPA1309 と VPA1397 の遺伝子間領域 (intergenic region) であった。また、Vp-PAI は 5 bp の Direct Repeat に挟まれた構造となっていた。この DR は RIMD22121918 では 1 コピーであったことから、Vp-PAI (もしくはその前駆体) のゲノム挿入時に target

site duplication により生成した構造であると推測される。本研究で明らかになった Vp-PAI の境界は、以前に bioinformatics により推測されたもの (Hurlery ら、2006) とやや異っていたが、本研究により、実験的に正確な境界が決定できたと考える。これにより、腸炎ビブリオ病原株のみが保有し、病原性の発現に必須な遺伝子をコードする領域が明確となった。

Vp-PAI の両端の塩基配列を見ると、Vp-PAI には、Inverted Repeat (IR) (16 bp) が左右両端にあり、また、内部にタンデムに並ぶ 4 対の短い IR (11 bp) を含む構造となっていた。さらに、Vp-PAI の両端の塩基配列は 5'-TG...CA-3' となっていた。これら Vp-PAI が持つ塩基配列の特徴は、Tn7、Mu などを含む mobile element の superfamily (Tn7 superfamily) と一致するものであった。Tn7 superfamily は、転移における触媒反応を担うトランスポゼースとそのエネルギーを供給する NTPase を持つ特徴がある。そこで、この superfamily のトランスポゼース、NTPase を Vp-PAI から探索したところ、VPA1395、VPA1394 が Tn7 superfamily のトランスポゼースである TnsB と、NTPase である TnsC それぞれと相同性を持つことが分かった。このように、Vp-PAI の塩基配列およびコードする遺伝子から、Tn7 superfamily との共通性が見出された。

Vp-PAI が挿入した領域に関して、他の *tdh* and/or *trh* 陽性株についてもゲノムダイレクトシーケンシング解析を行った。すると、調べた株全てにおいて、Vp-PAI の標的部位と同じ領域に通常の PCR では増幅できないサイズを持った未知の DNA 領域が組み込まれていた。また、その未知 DNA 領域の末端の配列は、Vp-PAI の両端と高い相同性を示した。このことから、両末端の配列が Vp-PAI に似た DNA 領域が *tdh* 陽性株だけでなく、*trh* 陽性株や *tdh*、*trh* 両陽性株にも存在することが明らかとなった。

以上より、本研究において、Vp-PAI の正確な境界を実験的に決定し、病原株と非病原株の持つ遺伝子群の違いを明確にした。さらに、Vp-PAI と Tn7 superfamily との類似性を示し、ゲノム上における Vp-PAI の形成に対する示唆を与えた。また、*tdh* 陽性株のみならず、*trh* 陽性株や *tdh*、*trh* 両陽性株ゲノムにも、Vp-PAI 両端と相同性が見られる DNA 領域を見出したことから、種々の病原性腸炎ビブリオが共通した機構により病原性遺伝子群を獲得した可能性を示した。

## 論文審査の結果の要旨

本論文において申請者は、*tdh*、*trh* 陰性腸炎ビブリオ RIMD22121918 株の一部塩基配列を解読し比較することで、2003 年に完了したゲノム解読では明らかにされていなかった、患者由来腸炎ビブリオ RIMD2210633 株が持つ Pathogenicity Island (Vp-PAI) の正確な境界を決定した。その結果、Vp-PAI は 80,042 bp からなり、VPA1310-VPA1396 の遺伝子を含む領域であることを明らかとした。また、Vp-PAI の両端塩基配列と内部にコードする遺伝子の両面から、Tn7 superfamily に属する可動性因子が Vp-PAI 形成に関与する可能性を示した。

これらの結果に加えて、RIMD2210633 株以外の *tdh* 陽性株や *trh* 陽性株においても、末端配列が Vp-PAI に似た DNA 配列が小染色体上の同じ領域に挿入していることを発見した。このことから、*tdh* 陽性株のみでなく、種々の病原性腸炎ビブリオ株の小染色体に、末端の塩基配列が Vp-PAI に似た因子が存在することを明らかとした。

以上の研究結果は、腸炎ビブリオの病原性に関する研究を進める上で重要な知見を提示したものであり、大阪大学大学院薬学研究科の博士の学位にふさわしいものであると認められる。